

09/807234

JC02 Rec'd PCT/PTO 06 APR 2001

EXPRESS MAIL CERTIFICATE

Date 4-6-01

Label No.

I hereby certify that, on the date indicated above, this paper or fee was deposited with the U.S. Postal Service & that it was addressed for delivery to the Assistant Commissioner for Patents, Washington, DC 20231 by "Express Mail Post Office to Addressee" service.

Name (Print)

Signature

PLEASE CHARGE ANY DEFICIENCY UP TO \$300.00 OR CREDIT ANY EXCESS IN THE FEES DUE WITH THIS DOCUMENT TO OUR DEPOSIT ACCOUNT NO. 04-0100

Customer No.:



07278

PATENT TRADEMARK OFFICE

Docket No.: 0136/0J067

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of: PARK, Tae-Shin; KIM, Sung-Keun;
KIM Jin-Hee and PARK, Mi-Sun

Serial No.: TBA (U.S. National Phase of International Application

No. PCT/KR00/01213 filed on October 26, 2000)

Confirmation No.: Art Unit: n/a

Filed: Concurrently herewith Examiner: n/a

For: GENOTYPING KIT FOR DIAGNOSIS OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS
INFECTION

AFFIRMATION OF PRIORITY CLAIM

Hon. Commissioner of
Patents and Trademarks
Washington, DC 20231
Attn.: Box PCT, DO/EO/US

April 6, 2001

Sir:

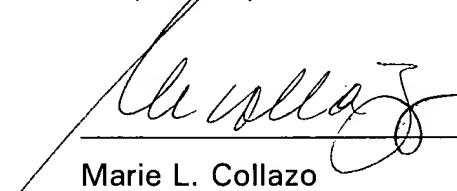
Priority has been claimed on the basis of Korean patent application No. 2000-13161 filed on March 15, 2000.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A certified copy of this patent application was received by the International Bureau on 24 November 2000, during the pendency of International Application No. PCT/KR00/01213.

Applicants herewith affirm the priority claim of the aforesaid Korean patent application under 35 U.S.C. §119.

Respectfully submitted,



Marie L. Collazo
Reg. No. 44,085
Registered Patent Agent

DARBY & DARBY P.C.
805 Third Avenue
New York, New York 10022
212-527-7700

Docket No. 0136/0J067

THIS PAGE BLANK (USPTO)

0918072844
PCT/KR 00/01213
RO/KR 04.11.2000.

KR00/1213

REC'D 24 NOV 2000

WIPO

PCT

대한민국 특허청 RECEIVED
KOREAN INDUSTRIAL PROPERTY OFFICE

OCT 04 2001

TECH CENTER 1600/2900

E3U

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Industrial
Property Office.

출원번호 : 특허출원 2000년 제 13161 호
Application Number

출원년월일 : 2000년 03월 15일
Date of Application

출원인 : 주식회사 바이오메드랩
Applicant(s)

PRIORITY
DOCUMENT

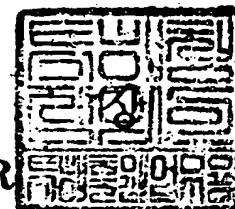
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000년 11월 04일



특허청

COMMISSIONER



【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2000.03.15
【발명의 명칭】	인유두종바이러스의 유전형 진단키트 및 상기 진단키트의 제조방법
【발명의 영문명칭】	diagnosis kit for genotyping of Human Papillomavirus and manufacturing method for thereof
【출원인】	
【명칭】	주식회사 바이오메드랩
【출원인코드】	1-1998-103291-6
【대리인】	
【성명】	조의제
【대리인코드】	9-1998-000509-2
【포괄위임등록번호】	1999-004127-1
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김성근
【성명의 영문표기】	KIM, Seong Keun
【주민등록번호】	680807-1664014
【우편번호】	139-203
【주소】	서울특별시 노원구 상계3동 77-27
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김진희
【성명의 영문표기】	KIM, Jin Hee
【주민등록번호】	650310-2009146
【우편번호】	134-050
【주소】	서울특별시 강동구 암사동 102-19
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	박태신
【성명의 영문표기】	PARK, Tae Shin
【주민등록번호】	740108-2024728

020000013161

2000/11/13

【우편번호】	120-112
【주소】	서울특별시 서대문구 연희2동 81-4
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	박미선
【성명의 영문표기】	PARK, Mi Sun
【주민등록번호】	630115-2690517
【우편번호】	121-230
【주소】	서울특별시 마포구 망원동 479-1
【국적】	KR
【심사청구】	청구
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사 를 청구합니다. 대리인 조의제 (인)
【수수료】	
【기본출원료】	20 면 29,000 원
【가산출원료】	5 면 5,000 원
【우선권주장료】	0 건 0 원
【심사청구료】	15 항 589,000 원
【합계】	623,000 원
【첨부서류】	1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 여성의 자구경부이상형성(cervical dysplasia)의 주요한 원인인 인유두종바이러스(Human Papillomavirus, HPV)의 유전형 진단키트 및 상기 진단키트를 제조하는 방법에 관한 것이다.

본 발명에 의한 인유두종바이러스의 유전형 진단키트는, 알데히드기로 유도된 글래스 위에 아민기로 변형된 HPV 타입-특이 올리고뉴클레오티드 프로브(type-specific oligonucleotide probe)들을 시프염기반응(Schiff base reaction)으로 고정하는 방법으로 제작된 마이크로어레이와, 비오틴을 표지된 HPV DNA 증폭산물과 마이크로어레이에 고정된 해당 프로브 올리고머의 하이브리디제이션 반응(hybridization reaction)을 검출하도록 비오틴-바인딩 단백질이 포함된 형광물질(streptavidin-R-phycoerythrin)을 포함하여 구성된다. 상기한 구성에 의하면, 인유두종바이러스 유전자의 유전형을 간단, 신속, 정확하게 대량으로 검출할 수 있는 이점이 있다.

【대표도】

도 1

【색인어】

인유두종바이러스, DNA 칩, 진단키트

【명세서】**【발명의 명칭】**

인유두종바이러스의 유전형 진단키트 및 상기 진단키트의 제조방법{diagnosis kit for genotyping of Human Papillomavirus and manufacturing method for thereof}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 본 발명에 의한 HPV의 올리고뉴클레오티드 마이크로어레이를 제작하는 단계를 보인 흐름도.

도 2는 본 발명에 의한 HPV의 올리고뉴클레오티드를 슬라이드에 고정하는 단계를 보인 흐름도.

도 3a 및 도 3b는 본 발명에 의한 HPV의 올리고뉴클레오티드를 실리레이티드 슬라이드에 고정하는 과정을 보인 개략도.

도 4는 본 발명에 의한 HPV DNA 타입16을 이용한 마이크로어레이 하이브리디제이션 실험의 결과를 보인 도면.

도 5는 본 발명에 의한 HPV DNA 타입18을 이용한 마이크로어레이 하이브리디제이션 실험의 결과를 보인 도면.

도 6은 본 발명에 의한 환자검체에서 추출한 DNA를 이용한 마이크로어레이 하이브리디제이션 실험의 결과를 보인 도면.

【발명의 상세한 설명】**【발명의 목적】****【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】**

- <7> 본 발명은 인유두종바이러스의 유전형 진단키트 및 그 진단키트의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 간편, 신속, 정확하게 대량으로 인유두종바이러스의 유전형을 진단할 수 있는 인유두종바이러스의 유전형 진단키트 및 그 진단키트의 제조방법에 관한 것이다.
- <8> 자궁암에는 자궁경부암, 자궁체부암, 자궁육종암 등이 있으나, 이중 자궁경부암의 경우는 매년 전세계적으로 약 45만명, 우리나라의 경우 약 6,000명의 새로운 환자가 발생하고 있다. 자궁경부암은 한국 여성암의 22.1%에 달하며(상피내암 포함), 발생률 1위, 사망률 2위를 차지하여, 자궁경부암의 예방, 진단 및 치료는 여성 보건에 있어서 중요한 문제로 남아 있다.
- <9> 자궁경부암은 성행위와 밀접한 관계가 있으며, 그 외에 흡연, 호르몬 복용, 헤르페스 심플렉스 바이러스 타입 II(Herpes simplex virus type II), 시토메가로바이러스 (Cytomegalovirus), 트리코모나스(Trichomonas) 감염 등도 연관 요인으로 알려져 있다.
- <10> 한편, 자궁경부암은 자궁경부 상피내종양이라는 암 전단계를 걸쳐 진행되는데, 인유두종 바이러스(Human papillomavirus, HPV)의 감염이 자궁경부 종양의 발생에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 특히, 특정 유전형(genotype)의 HPV에 감염된 경우에 종양으로 진행할 가능성은 더욱 높아지게 된다. 인유두종 바이러스가 자궁경부암의 주요원

인으로 밝혀진 이후로 현재까지 HPV는 70여 가지의 유전형이 발견되었으며 병소의 위치와 병변의 진행정도에 따라 각각 특이한 HPV 유전형이 선택적으로 발견되어 HPV 감염의 생물학적 특징의 다양성을 인식하게 되었다. 생식기 감염 HPV 유전형중 10개 이상이 고위험군으로 분류되어 자궁경부암과 연관되는 것으로 알려져 있으며, 따라서 이는 자궁경부암의 진단과 예방에 중요한 의미를 지닌다.

<11> 자궁경부암의 가장 간단한 조기진단법은 병리세포학적 검사인 자궁경부 세포진검사로서 자궁표면의 노화된 세포를 채집, 염색하여 상피세포 핵주위에 공동화(perinuclear halo)를 보이는 코일로사이토시스(koilocytosis)등의 특징적인 병리소견으로 진단하는 방법으로 그 진단율이 1~15%로 낮고 단일검사만으로는 진단상 많은 제한이 있다. 이를 보완하기 위하여 질확대경진을 시행하면 HPV 감염을 70%까지 진단할 수 있으나, 장비가 고가이며 고도로 숙련된 판독자가 필요하고, 악성화위험도가 다른 HPV 유전형을 분류할 수 없다는 단점이 있다. 이에 따라 자궁경부암 전구 병변의 진단을 위한 선별검사로서 또는 자궁경부 세포진 검사의 보조적 수단으로서 HPV의 존재와 유전형을 확인하는 기법들에 관한 연구가 진행되어 왔다.

<12> 상기 HPV의 존재 및 유전형 확인 방법은 크게 HPV DNA의 직접확인법과 HPV DNA의 증폭을 이용하는 방법으로 나눌 수 있다. 상기 HPV DNA의 직접확인법으로서 리퀴드 하이브리디제이션(liquid hybridization, Hybrid Capture by Digene Diagnostics, Silver Spring, MD), HPV 타입-특이 프로브(type-specific probe)를 이용한 서던블롯(Southern blot) 및 도트블롯(Dot blot), 필터 인 시튜 하이브리디제이션(Filter in situ hybridization, FISH) 등이 있다.

<13> 그리고, HPV DNA의 증폭을 이용하는 방법으로서는, 타입-특이 PCR(type-specific

polymerase chain reaction), 제너럴-프라이머 PCR(general-primer PCR) 등이 있다. 제너럴 프라이머 세트(General primer set)를 이용하여 증폭된 HPV DNA는 도트 블롯 하이브리디제이션(dot blot hybridization), 마이크로티터 플레이트 하이브리디제이션(microtiter plate hybridization), 또는 라인 프로브 어세이(line probe assay)등의 방법을 통해 유전형을 검색할 수 있다.

<14> 상기 라인 프로브 어세이는 니트로셀루로오즈막(nitrocellulose membrane)에 올리고뉴클레오티드 프로브를 고정하여 20여가지의 타입을 검색하는 방법인데, 탐지감도와 데이터해석상 여러 문제점이 있다.

<15> 또한 상품화되어 있는 하이브리드 캡처 키트(Hybrid Capture kit, Digene Diagnostics, MD, USA, www.digene.com)는 HPV DNA를 시료로부터 쉽게 분리하여 PCR 증폭과정 없이 검색할 수 있으나, 해당 HPV DNA가 고위험군(high risk group)에 속하는지 저위험군(low risk group)에 속하는지만을 알 수 있을 뿐 정확한 유전형판별이 불가능하다. 따라서, 고위험군중에서도 특별히 주목해야 할 유전형(type 16, 18), 즉 암발생률과 상관관계가 매우 높은 타입을 다른 고위험군(중위험군(intermediate group)이라고 할 수 있음)과 구별할 수 없다는 문제점이 있다. 또한 상기 방법은 RNA 프로브를 이용하므로 안정성이 낮고 오염가능성을 배제할 수 없는 문제점이 있다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<16> 본 발명은 상기 문제점을 해결하기 위해서 안출된 것으로서, 본 발명의 첫번째 목적은, HPV의 존재 및 유전형을 간단하고 정확하게 진단할 수 있는 인유두종바이러스의 유전형 진단키트를 제공하는 것이다.

- <17> 본 발명의 두번째 목적은, 안정성이 높고 오염가능성이 적은 인유두종바이러스의 유전형 진단키트를 제공하는 것이다.
- <18> 본 발명의 세번째 목적은, HPV의 존재 및 유전형을 간단, 신속, 정확하게 대량으로 진단할 수 있는 상기 인유두종바이러스의 유전형 진단키트를 용이하게 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

- <19> 상기 목적을 달성하기 위해서, 본 발명에 의한 인유두종바이러스의 유전형 진단키트는, 인유두종바이러스의 DNA 올리고뉴클레오티드 칩과; 상기 DNA 올리고뉴클레오티드 칩과 시료의 하이브리제이션 반응을 탐지하는 표지수단을 포함하여 구성되는 것을 특징으로 한다.
- <20> 상기 구성에 의하면, HPV 존재 및 유전형을 간단, 신속, 정확하게 대량으로 진단할 수 있어, 감염의 위험도를 예측할 수 있는 이점이 있다. 또한, 본 발명에 의한 인유두종바이러스의 유전형 진단용키트는 RNA 대신에 DNA 칩을 이용하기 때문에 안정성이 높고 오염가능성이 적은 이점이 있다.
- <21> 본 발명에 의한 구체적인 실시예에 의하면, 본 발명에 의한 인유두종바이러스의 유전형 진단키트는, 상기 DNA 칩이 아민기로 변형된 인유두종바이러스의 타입-특이 DNA 프로브와 글래스에 유도된 알데히드의 시프염기반응에 의해 형성되는 것을 특징으로 한다.
- <22> 상기한 구성에 의하면, 인유두종바이러스 유전형 진단키트는 DNA 프로브가 안정적으로 고정되어 있는 이점이 있다.
- <23> 본 발명에 의한 보다 구체적인 실시예에 의하면, 본 발명에 의한 인유두종바이러스

의 유전형 진단키트는, 상기 DNA 프로브가 인유두종바이러스 L1 DNA인 것을 특징으로 한다.

<24> 상기한 구성에 의하면, 인유두종바이러스의 유전형을 보다 정확하게 검색할 수 있는 이점이 있다.

<25> 그리고, 본 발명에 의한 다른 실시예에 의하면, 본 발명에 의한 인유두종바이러스의 유전형 진단키트의 제조방법은, 인유두종바이러스의 타입-특이 DNA 프로브를 아민기로 변형시키는 제 1단계와; 클래스 위에 알데히드기를 유도시키는 제 2단계와; 상기 변형된 DNA 프로브를 시프염기반응(Schiff base reaction)에 의해 상기 클래스에 고정시키는 제 3단계를 포함하여 구성되는 것을 특징으로 한다.

<26> 상기한 구성에 의하면, DNA 칩(chip), 즉 올리고뉴클레오티드 마이크로어레이(oligonucleotide microarray)를 이용하여 인유두종바이러스의 유전형을 간단하고 정확하게 대량으로 진단할 수 있는 인유두종바이러스의 유전형 진단키트를 용이하게 제조할 수 있는 이점이 있다.

<27> 실시예

<28> 이하 본 발명의 바람직한 실시예 및 비교예를 기재한다. 그러나, 하기 실시예는 본 발명의 구성 및 효과를 입증하기 위한 실시예일 뿐 본 발명이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<29> 1. 올리고뉴클레오티드 마이크로어레이(Oligonucleotide microarray)의 제작

<30> 도 1에 도시된 바와 같이, 올리고뉴클레오티드 마이크로어레이를 제작하는 단계는 크게 HPV 올리고뉴클레오티드를 합성하는 단계(제 10단계)와, HPV 올리고뉴클레오티드를

슬라이드에 고정하는 단계(제 20단계)로 구성된다.

- <31> (1) HPV 올리고뉴클레오티드(Oligonucleotide) 합성
- <32> HPV 유전형 검출을 위하여 사용된 각 HPV 유전형에 특이적 올리고뉴클레오티드 프로브는 5' 말단에 아민(amine)기를 유도하여 합성한다(표 1 참조).

표 1. 올리고뉴클레오티드 시퀀스(Oligonucleotide sequences)

<34> 이름(Name)	시퀀스(Sequence)	설명(Description)
HPV 16	5'-Amine-gtcattatgtgctgcatatctacttcaga -3'	Probe
HPV 18	5'-Amine-tgccttacacagtctcctgtacctggca -3'	Probe
HPV 31	5'-Amine-tgtttgtgctgcaattgcaaacagtgatac -3'	Probe
HPV 33	5'-Amine-tttatgcacacaaggtaacttagtgcacgtac -3'	Probe
HPV 35	5'-Amine-gtctgtgttctgtctgtcttagtga -3'	Probe
HPV 45	5'-Amine-acacaaaatccctgtgccaagtgatcatatgac -3'	Probe
HPV 51	5'-Amine-agcactgcccactgctgcggttccccaaaca -3'	Probe
HPV 52	5'-Amine-tgctgagggtaaaaaggaaaggcacatataa -3'	Probe
HPV 56	5'-Amine-gtactgctacagaacagttaaagttaatatg -3'	Probe
HPV 6	5'-Amine-atccgttaactacatctccacatacacaa 3'	Probe
HPV 11	5'-Amine-atgtgcatactgtgtctaaatctgcatacataactaa-3'	Probe
HPV 58	5'-Amine-attatgcactgaagtaactaaggaaggtaac -3'	Probe

- <35> (2) HPV 올리고뉴클레오티드의 고정(도 2의 참조)
- <36> 알데하이드기(Aldehyde group)가 유도된 실리레이티드 슬라이드(silylated slide, CSS-100, CEL, Houston, TX, 도 3a 참조)위에 합성된 올리고뉴클레오티드 프로브들(표 1)를 다음의 방법으로 고정한다.
- <37> 우선, 합성된 올리고뉴클레오티드 프로브를 3X SSC(0.05 M sodium citrate, 0.45 M NaCl)에 200 pmol/ul가 되도록 녹인 후 실리레이티드 슬라이드 위에 0.1 ul씩 스파팅(spotting)한다(제 22단계). 그리고, 상기 스파팅한 것을 37°C의 습한 인큐베이터(humidified incubator)에서 4시간 동안 반응시켜 시프염기반응(Schiff base reaction)을 유도한다(제 24단계).

<38> 상기 반응이 끝난 후 0.2% 소디움 도디실설페이트(sodium dodecyl sulfate, SDS) 용액에 슬라이드를 1분간 험하게 세척하고(제 26단계), 3차 증류수에 1분간 세척(제 28 단계) 후, NaBH₄용액(0.1g NaBH₄, 30 ml phosphate buffered saline(PBS), 10 ml ethanol)에서 5분 동안 환원시킨다(제 30단계). 다시 3차 증류수에 1분간 세척하고(제 32단계) 공기 건조한 후 사용할 때까지 상온의 암실에서 보관한다(제 34단계).

<39> 2. 표본 채취 보관 및 DNA 추출

<40> (1) 환자 검체

<41> 사람의 자궁경부조직(Human cervical swabs)은 카톨릭대로부터 제공받았으며, 하이브리드 캡처 키트(Hybrid Capture kit, Digene Diagnostics, MD, USA)로 고위험군 HPV의 감염유무가 검사된 것으로써 하이브리드 캡처 키트의 DNA 추출용 버퍼에 보관되어 있었다. PCR 증폭 전, iNtRON 게노믹 DNA 키트(iNtRON genomic DNA kit)를 이용하여 DNA를 농축, 정제하였으며 구체적인 내용은 다음과 같다.

<42> ① 자궁경부샘플을 취하여 적량의 프로티네이즈 K를 가하고 37도에서 15시간 이상 처리한 후 95도에서 10분간 효소를 불활성화시켰다.

<43> ② 적량의 라이시스 버퍼(lysis buffer)를 펠릿에 가한 후 65도에서 10분간 배양한다.

<44> ③ 적량의 sol III를 첨가하여 잘 섞은 후 얼음 위에 5분간 방치한다.

<45> ④ 1200rpm으로 5분간 원심분리한 후 상청액을 새 튜브에 옮긴다.

<46> ⑤ 적량의 이소프로판을 섞은 후 원심분리(12,000, 5분)하여 펠릿을 회수한다.

<47> ⑥ 적량의 70% 에탄올을 가하고 10분간 원심분리한 회수한 펠릿을 적량의 버퍼나

증류수에 녹인다.

<48> (2) HPV 세포주

<49> 양성 대조군으로는 한국세포주은행에서 구입한 SiHa 세포주(HPV-16, KCLB 30035, Human squamous carcinoma, cervix)와 HeLa 세포주(HPV-18, KCLB 10002, Human epithelial carcinoma, cervix)에서 증폭한 HPV DNA를 사용하였다. 세포주를 적량의 프로티네이즈 K로 처리하고 95도에서 효소를 불활성화시킨 후, 그 일부를 PCR 반응에 사용하여 HPV DNA를 증폭하였다.

<50> 3. 올리고뉴클레오티드 마이크로어레이(Oligonucleotide microarray)를 이용한 HPV 검색

<51> (1) 중합효소연쇄반응(PCR)

<52> HPV 감염 여부 검출을 위한 프라이머는 GP5+와 비오틴이 결합된 GP6+(biotin-GP6+)를 사용하며 증폭될 시퀀스의 길이는 150 bp으로 한다. 추출된 DNA의 적합성을 보기 위하여 사용된 베타-글로빈 프라이머(β -globin primer)는 PC03/PC04이며 크기는 110 bp이다.

<53> PCR은 다음의 방법으로 시행한다. 50 μ l의 반응혼합물을 용액을 만들며, 이는 PCR 완충용액 (50mM KC1, 4mM MgCl₂, 10mM Tris-HCl, pH 8.3)과 0.1 μ g의 DNA, 4.5 mM MgCl₂, 각 50pmol의 HPV 프라이머 GP5+(5'-TTTGTACTGTGGTAGATACTAC-3')와 비오틴-GP6+(3'-biotin-CTTATACTAAATGTCAAATAAAAG-5'), 40 μ M의 각 dATP, dCTP, dGTP(Pharmacia), 30 μ M의 dTTP(Pharmacia), 10 μ M의 비오틴-dUTP(Boehringer Manheim), 1 유니트 태크 폴리머라제(unit Taq polymerase, Takara, Japan)를 포함한다.

<54> PCR 서머싸이클러(thermocycler, Perkin-Elmer Cetus, CA, USA)에서 94℃에서 1분간 변성(denaturation), 40℃에서 1분간 프라이머 결합(primer annealing), 72℃에서 1분간 연장(extension)과정을 40회 반복하여 DNA를 증폭한다. 증폭한 PCR DNA 용액중 2 μl 의 시료를 취하여 로딩 다이/loading dye)와 섞은 다음 2% 한천 젤(agarose gel)에서 전기영동하여 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 에티움 브로마이드(Ethidium Bromide, Sigma) 용액에서 15분간 염색한 후, 자외선 하에서 DNA 크기를 확인한다. 검체의 DNA 보존상태를 평가하기 위하여 PC03/PC04 프라이머세트를 사용하여 베타-글로빈 유전자 증폭시험을 하며, 베타-글로빈 유전자가 증폭된 DNA만을 실험에 사용한다.

<55> (2) 하이브리디제이션(Hybridization)

<56> HPV 올리고뉴클레오타이드 프로브가 고정된 기판에 PCR에 의하여 증폭된 HPV DNA의 하이브리디제이션을 실시한다. 하이브리디제이션 반응실(Hybridization reaction chamber)로 200ul 용량의 커버슬립(cover slip, GRACE Bio-Labs, USA)을 사용한다.

<57> 20-30ul의 증폭산물을 95℃에서 10분간 변성 시킨 후 얼음에 10분간 방치한 다음 하이브리디제이션 용액으로 6X 세일라인-소디움 포스페이트(saline-sodium phosphate-EDTA buffer(SSPE), Sigma, St. Louis, MO)와 0.2% 소디움 도디실 셀페이트(sodium dodecyl sulfate(SDS), Sigma)을 사용하여 30-40℃에서 실리레이티드 슬라이드(silylated slide)에 고정된 프로브와 1-2시간 반응시킨다.

<58> 하이브리디제이션 반응이 끝난 후 3X SSPE로 2분, 1X SSPE로 2분간 글래스를 세척하여 실온에서 공기 건조하고, 5 μl 스트렙타비딘-R-피코에리스린 컨쥬게이트(Streptavidin-R-Phycoerythrin conjugate, conc. 50 $\mu\text{g/ml}$)를 95 μl 3X SSPE에 혼합한 용액을 첨가하여 25분간 실온에서 염색한 다음, 3X SSPE로 세척하고 건조시킨 후 콘포칼

레이저 스캐너(confocal laser scanner, GMS 418 Array Scanner TaKaRa)를 이용하여 형광신호를 분석하였다(excitation 480 nm, emission >520 nm).

<59> DNA 칩은 유전자 변이해석을 단시간에 대량으로 해주는 도구로서 근래에 그 중요성 및 진척도가 날로 증가하고 있다. 본 발명은 상기 DNA 칩 기술을 적용한 자궁경부암의 조기진단 및 예방에 필수적인 HPV 유전형검색을 위한 새로운 진단키트 및 상기 진단키트 제조방법에 관한 것이다.

<60> 상기 실시예에서는 단일가닥 HPV 타입-특이 프로브(약 30mer)을 마이크로스코스픽 슬라이드 글래스(microscopic slide glass)에 고정하고, 상용하는 HPV 세포주 또는 플라스미드로부터 PCR로 증폭된 HPV 표적 DNA 150mer와 하이브리디제이션을 실시하여 테스트하였다. 프로브의 고정은 슬라이드 글래스의 알데히드기와 프로브의 아민기의 시프염기 반응(Schiff base reaction)을 이용하여 효율적으로 수행되며, 생성된 이민결합(imine bond)를 NaBH₄로 환원하여 화학적 안정성을 증가시켰다(도 3b 참조).

<61> 한편, 일 실시예에서는 10가지(HPV 유전형 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 56, 58)의 고위험군 프로브를 이용하여 마이크로어레이를 제작하였으며, 최적 프로브 농도를 산정하기 위하여 100pmol/ul-1nmol/ul 까지 프로브 DNA 용액의 농도를 다양하게 변화시키면서 이에 따른 하이브리디제이션의 효율을 조사하였다. 그 결과, 200pmol/ul의 농도에서 최상의 반응효율을 얻을 수 있음이 확인되었다.

<62> 그리고, 최적의 조건으로 제작된 10가지 HPV 유전형에 상보적 프로브를 고정한 마이크로어레이는 각 유전형 플라스미드의 PCR 산물을 이용하여 평가하였다. HPV 16과 HPV 18 세포주의 PCR은 GP5⁺/비오틴-GP6⁺ 프라이머세트(primer set)와 비오틴-dUTP를 이

용하였으며, 그 결과 비오틴으로 표지된 150bp 증폭산물(amplicon)를 높은 수율로 얻었다.

<63> 상기 증폭산물을 변성하고 하이브리디제이션 챔버를 이용하여 마이크로어레이와 30-40°C에서 1-2 시간 동안 하이브리디제이션시킨 후, 비오틴-바인딩 단백질(biotin-binding protein)이 포함된 형광물질(streptavidin-R-phycoerythrin)로 하이브리디제이션 사이트(hybridization site)를 염색하였다. 스트렙타비딘-R-피코에리스린은 흡광계수(extinction coefficient)가 매우 높은 형광단(fluorophore)과 4개의 비오틴-바인딩 사이트를 가진 단백질의 접합체(conjugate)으로서 마이크로어레이를 컨포칼레이저스캐너(confocal laser scanner, GMS 418 Array Scanner)로 스캔닝하였을 때 하이브리디제이션이 일어난 위치를 고감도로 검출(detection)할 수 있게 한다.

<64> 따라서 PCR 반응시 비오틴-dUTP를 첨가하여 표적(target) DNA를 임의로 표지(labeling)하는 것이 검출 감도(detection sensitivity)의 증가에 필수적이며, 실제로 임의로 표지한 표적 DNA의 하이브리디제이션 신호(signal)가 바이오틴레이티드 프라이머(biotinylated primer)만을 사용했을 때보다 현저하게 증폭됨을 관찰할 수 있었다.

<65> 도 4 및 도 5는 세포주로부터 증폭한 HPV 16, HPV 31 DNA를 이용한 마이크로어레이 하이브리디제이션 실험의 결과를 나타낸다. 도 4 및 도 5에서 도면 아래의 원은 프로브 종류에 따른 위치를, PC(positive control)는 프로브의 위치를 나타내기 위한 마커를 표시한다.

<66> 도 4 및 도 5에서, HPV 16, HPV 18 DNA의 증폭산물로부터 기인한 하이브리디제이션 신호가 다른 심각한 교차-하이브리디제이션(cross-hybridization) 없이 HPV 16, HPV 18 프로브에서만 각각 깨끗하게 나타남을 관찰할 수 있다.

- <67> 도 6은 환자검체에서 증폭한 HPV DNA를 이용한 마이크로어레이 하이브리디제이션 실험의 결과를 나타낸다. 이 실험에서 사용된 검체는 하이브리드 캡처 키트(Hybrid Capture kit, Digene Diagnostics, MD, USA)로 검사하여 고위험군 HPV에 감염되어 있음이 밝혀진 것으로써 하이브리디제이션 결과 도 6의 왼쪽의 검체는 HPV 16, 오른쪽의 검체는 HPV 58임이 나타났다. 같은 실험조건에서 하이브리드 캡처 키트 검사로 고위험군 HPV에 감염되어 있음이 판정된 여러 검체가 HPV 16, 31, 51, 56, 58 등으로 유전형이 판별되었다.
- <68> 상기 실시예에서는 10개의 프로브가 고정된 올리고뉴클레오티드 마이크로어레이를 이용한 HPV의 유전형 진단키트를 제작하였으나, 보다 광범위한 검색을 위해 프로브 올리고머의 종류를 늘린 HPV DNA 칩도 본 발명에 의해 가능하다.
- <69> 본 발명에 의한 올리고뉴클레오티드 마이크로어레이를 이용한 HPV의 유전형 진단 키트는 신속간편하며 정확하게 HPV 감염여부 및 유전형을 검출할 수 있어서 자궁경부암의 조기진단, 예방 및 치료에 큰 기여를 하는 이점이 있다.
- 【발명의 효과】**
- <70> 상술한 바와 같이 본 발명에 의한 인유두종바이러스의 유전자형 진단키트는 DNA 칩을 이용하기 때문에, 단순한 위험도 진단을 넘어서 정확한 유전형판별이 가능하여 암의 진단 및 백신을 이용한 HPV 감염의 예방과 치료에 중요한 정보를 제공할 수 있는 효과가 있다.
- <71> 본 발명의 두번째 효과는, DNA 칩을 이용하므로 안정성을 높일 수 있고 오염문제도 방지할 수 있다는 점이다.

<72> 본 발명의 세번째 효과는, 형광물질을 표시수단으로 이용하므로 레이저스캐너로 하이브리드제이션신호를 분석함으로서 간단하고 정확하게 유전형을 검색할 수 있다는 점이다.

<73> 본 발명의 네번째 효과는, 인유두종바이러스의 L1 유전자를 이용하여 DNA 칩, 즉 올리고 뉴클레오티드 마이크로 어레이를 제작하고, 하이브리디제이션 반응을 형광물질을 이용하여 검출할 수 있는 진단키트를 제조하는 방법으로 구성되어 있다. 따라서, 본 발명에 의하면 신속, 정확하게 대량으로 HPV 유전형 진단이 가능한 진단키트를 용이하게 제조할 수 있는 효과를 도모할 수 있다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

인유두종바이러스(Human Papillomavirus, HPV)의 DNA 올리고뉴클레오티드 칩과;
상기 DNA 올리고뉴클레오티드 칩과 시료의 하이브리제이션 반응을 탐지하는 표지수
단을 포함하여 구성되는 것을 특징으로 하는 인유두종바이러스의 유전형 진단용키트.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 DNA 칩은 아민기로 변형된 인유두종바이러스 타입-특이 DNA
프로브와 글래스에 유도된 알데히드의 시프염기반응에 의해 형성되는 것을 특징으로 하
는 인유두종바이러스의 유전형 진단용키트.

【청구항 3】

제 2항에 있어서, 상기 DNA 프로브는 인유두종바이러스의 L1 DNA인 것을 특징으로
하는 인유두종바이러스의 유전형 진단용키트.

【청구항 4】

제 2항 또는 제 3항에 있어서, 상기 DNA 프로브의 농도는 150-250pmol/u1인 것을
특징으로 하는 인유두종바이러스의 유전형 진단키트.

【청구항 5】

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 시료의 DNA를 증폭시킬 수 있는 증폭수단을 더
포함하여 구성되는 것을 특징으로 하는 인유두종바이러스의 유전형 진단용키트.

【청구항 6】

제 5항에 있어서, 상기 증폭수단은,

GP5^{+/6+} 프라이머시스템과,
150bp 증폭기를 포함하여 구성되는 것을 특징으로 하는 인유두종바이러스의 유전형
진단용키트.

【청구항 7】

제 6항에 있어서, 상기 증폭수단은, 비오틴-dUTP을 더 포함하여 구성되는 것을 특
징으로 하는 인유두종바이러스의 유전형 진단용키트.

【청구항 8】

제 6항 또는 제 7항에 있어서, 상기 표지수단은 상기 비오틴-바인딩 프로테인을 포
함하는 형광물질인 것을 특징으로 하는 인유두종바이러스의 유전형 진단용키트.

【청구항 9】

제 8항에 있어서, 상기 형광물질은 스트렙타비딘-R-피코에리스린
(streptavidin-R-phycoerythrin)인 것을 특징으로 하는 인유두종바이러스의 유전형 진단
키트.

【청구항 10】

제 1항 또는 제2항에 있어서, 상기 DNA 오리고뉴클레오티드 칩은,
DNA 프로브의 위치를 알려주는 파지티브 콘트롤(Positive control)을 포함하는 것을
특징으로 하는 인유두종바이러스의 유전형 진단키트.

【청구항 11】

인유두종바이러스의 타입-특이 DNA 프로브를 아민기로 변형시키는 제 1단계와;
글래스 위에 알데히드기를 유도시키는 제 2단계와;

상기 변형된 DNA 프로브를 시프염기반응(Schiff base reaction)에 의해 상기 글래스에 고정시켜 DNA 칩을 만드는 제 3단계를 포함하여 구성되는 것을 특징으로 하는 인유두종바이러스의 유전형 진단키트의 제조방법.

【청구항 12】

제 11항에 있어서, 제 1단계의 상기 DNA 프로브는 L1의 올리고뉴클레오티드인 것을 특징으로 하는 인유두종바이러스의 유전형 진단키트의 제조방법.

【청구항 13】

제 11항 또는 제 12항에 있어서, 상기 DNA 프로브의 농도는 150-250pmol/u1인 것을 특징으로 하는 인유두종바이러스의 유전형 진단키트의 제조방법.

【청구항 14】

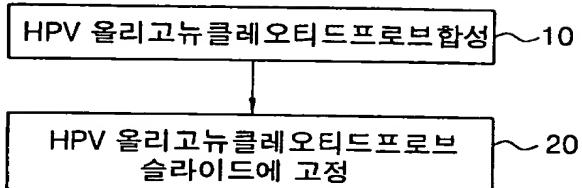
제 13항에 있어서, 상기 DNA 프로브의 농도는 200pmol/u1인 것을 특징으로 하는 인유두종바이러스의 유전형 진단키트의 제조방법.

【청구항 15】

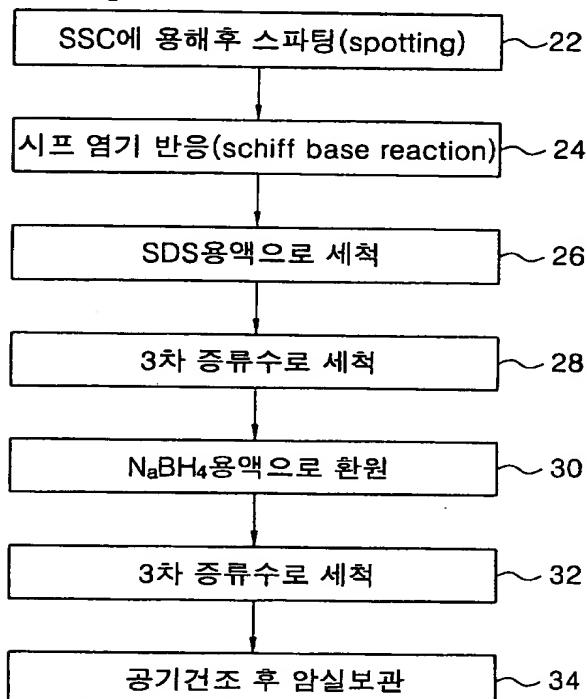
제 11항 또는 제 12항에 있어서, 제 3단계에서 고정으로 형성되는 이민결합(imine bond)을 NaBH₄로 환원하는 단계를 더 포함하여 구성되는 것을 특징으로 하는 인유두종바이러스의 유전형 진단키트의 제조방법.

【도면】

【도 1】



【도 2】



【도 3a】

CHO CHO CHO CHO

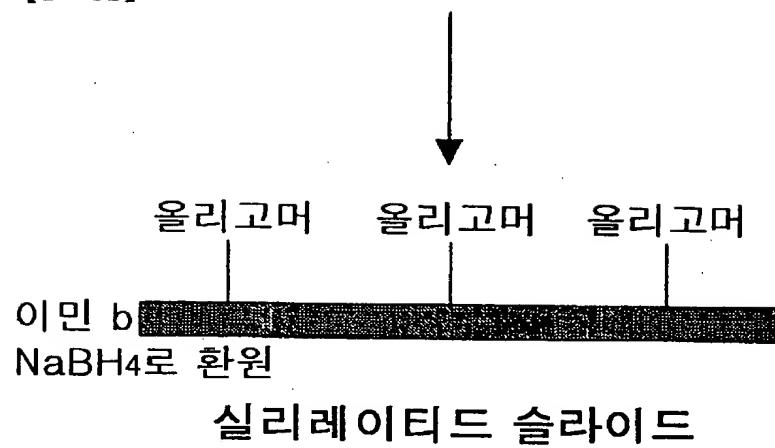


실리레이티드 슬라이드

20000013161

2000/11/13

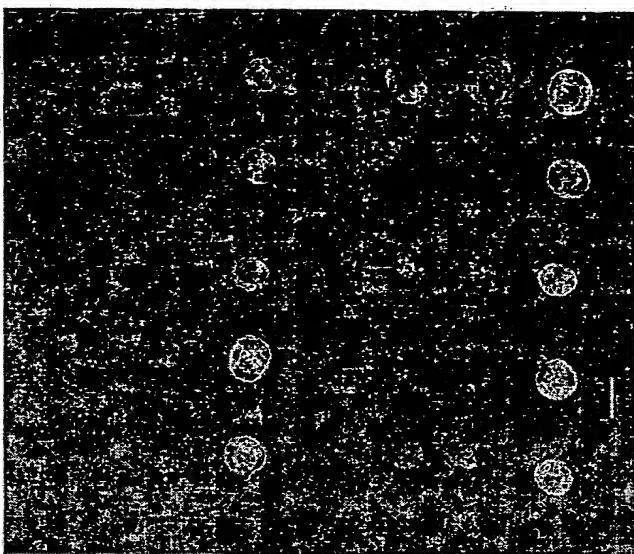
【도 3b】



20000013161

2000/11/13

【도 4】



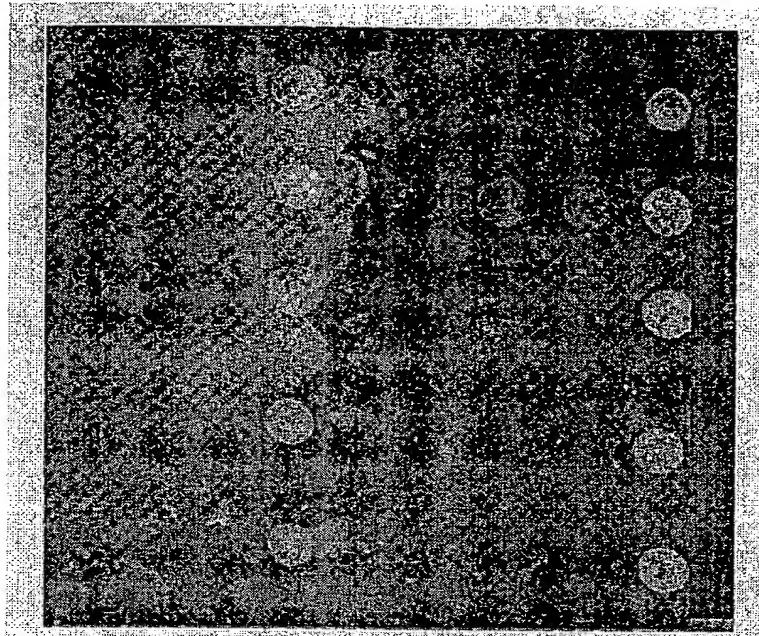
	PC				PC		
45	O	O	O	16	O	O	O
51	O	O	O	18	O	O	O
52	O	O	O	31	O	O	O
56	O	O	O	33	O	O	O
58	O	O	O	35	O	O	O

PC: positive control

20000013161

2000/11/13

【도 5】



PC PC

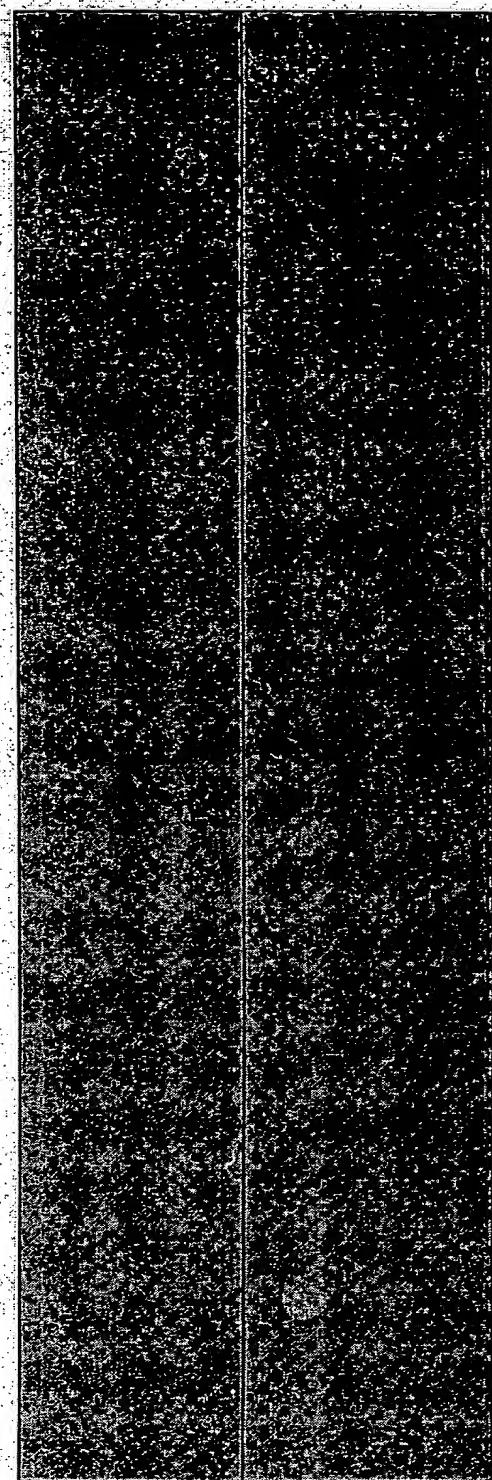
45	O	O	O	16	O	O	O
51	O	O	O	18	O	O	O
52	O	O	O	31	O	O	O
56	O	O	O	33	O	O	O
58	O	O	O	35	O	O	O

PC: positive control

200000013161

2000/11/13

【도 6】



#16

#18

#31

#33

#35

#45

#51

#52

#56

#58